# 牛乳に含まれるアディポサイトカインの定量と機能探索

三重大大学院生物資源学研究科：青木　直人

## 【研究の背景および目的】

乳汁には新生児の成長に必要な様々な栄養素、生理活性物質が含まれている。とりわけ興味深いのは、主として脂肪細胞が合成・分泌するレプチン(Casabiell, Pineiro et al. 1997[5]; Houseknecht, McGuire et al. 1997[6]；Aoki, Kawamura et al. 1999)[2]、アディポネクチン(Bronsky, Karpisek et al. 2006[4]; Martin, Woo et al. 2006)[9]、レジスチン(Ilcol, Hizli et al. 2008)[7]などいわゆるアディポサイトカインと総称される一群のタンパク質がヒトやマウスの乳汁に存在することが報告され､腸管への作用を介してエネルギー代謝を制御する可能性が想定されている。牛乳中にもレプチンの存在が示唆されているが、定量法の不備から結論には至っていない(Lage, Baldelli et al. 2002[8]; O'Connor, Funanage et al. 2003[10])。哺乳動物に特有な乳腺機能は種間で高度に保存されていることを鑑みると、牛乳中にもこれら一連のアディポサイトカインが存在する可能性は高いと考えられる。またヒト、マウスおよびウシ由来のレプチン、アディポネクチン、レジスチンではそれぞれ種間で８０％以上の相同性があり、高次構造形成に必要なシステイン残基もほぼ完全に保存されている。さらに、ヒト消化管上皮におけるアディポサイトカインに対する特異受容体の発現も確認されているので(Yoneda, Tomimoto et al. 2008)[12]、牛乳を介して摂取されたこれらアディポサイトカインがヒトに対しても作用する可能性も十分考えられる。

そこで本研究では、牛乳中に存在するアディポサイトカインを免疫化学的に同定・定量することを第一の目的とする。さらに、これらアディポサイトカインの腸管内での安定性を検討し、ヒト腸上皮培養細胞を用いてウシアディポサイトカインのヒト腸管における作用、機能発現の可能性を探る。

## １．ウシ・アディポサイトカインcDNAのクローニング

### 【材料および方法】

ウシ乳腺cDNAライブラリーは以前に調製したものを利用した(Aoki, Kishi et al. 1995)[3]。ウシ脂肪組織は地方の畜殺場より入手した。RNAの抽出は一般的なAGPC法により、Trizol試薬を用いて行った。cDNAの合成はトランスクリプターファーストストランドcDNA合成キットを用いて行った。目的遺伝子の増幅にはExTaq DNA polymeraseあるいはPyrobest DNA polymeraseを用いた。ウシ・アディポネクチン（GenBank Accession No. NM_174742）、ウシ・レプチン（GenBank Accession No. NM_173928）、ウシ・レジスチン（GenBank Accession No. BC148022）cDNAの増幅には表1に示した特異プライマーを用いた。増幅産物はアガロースゲル電気泳動により分画後、QIAEX II Gel Extraction Kitを用いて抽出後、 pGEM-T-Easy vectorにTAクローニングした。塩基配列はBigDye® Terminators v1.1 Cycle Sequencing KitあるいはBigDye® Terminators v3.1 Cycle Sequencing KitおよびABI PRISM® 3100 Genetic Analyzerを用いて決定した。

【結果および考察】

・ウシ乳腺cDNAライブラリーを鋳型としたPCRによるcDNAクローニング

マウスのレプチンは脂肪細胞以外にも乳腺組織で発現することが報告されているので(Aoki, Kawamura et al. 1999)[2)]、まず最初にウシ乳腺cDNAライブラリーを鋳型として増幅を試みた。しかしながら、予想に反してウシ乳腺cDNAライブラリーを鋳型としたPCRではレプチンを含む目的とするウシアディポサイトカインcDNAの増幅は全く認められなかった（図１）。カゼインや乳脂肪球皮膜関連遺伝子のcDNAは問題なく増幅されているので(Aoki, Kishi et al. 1995)[3)]、cDNAライブラリーのクオリティには問題ないと思われるが、ひとまずこの試みは中断し、本来アディポサイトカインが発現していると考えられる脂肪組織由来RNAを用いたRT-PCRを試みた。

・ウシ脂肪組織RNAを鋳型としたRT-PCRによるcDNAクローニング

ウシ脂肪組織から抽出したRNAの一部をアガロースゲル電気泳動で確認したところ、28S,18SリボゾーマルRNAを含む典型的な泳動パターンが得られたので(図２)、抽出したRNAのクオリティは問題ないと判断し、oligo-dTプライマーを用いてcDNAを合成した。上記表1に示したプライマーセットを用いてPCRを実施したところ、図３に示すように幾つかのマイナーバンドも増幅されたものの、予想されるサイズの主要バンドがそれぞれ1本ずつ確認された。それぞれゲルから抽出し、pGEM-T-Easyベクターにクローニングして塩基配列を確認したところ、データベースにある配列と完全に一致した（図４－６）。以上のようにRT-PCRによりウシ・アディポネクチン、レプチン、レジスチンのcDNAのクローニングに成功した。

## ２．ウシ・アディポサイトカインの哺乳動物細胞による発現と分泌

【材料および方法】

哺乳動物発現ベクターとしてpEF1/Myc-His Aを用いた。C末端にMycタグおよびヒスチジンタグを読み枠を合わせて融合させるために、表２に示すような5’末端にEcoRI認識配列を、3’末端にXbaI認識配列をそれぞれもつプライマーを新たに合成し、上記１でクローニングされたそれぞれのウシ・アディポサイトカインcDNAを鋳型としてPCRを実施した。増幅したバンドを上記の様に抽出、クローニングした後、塩基配列を確認した。配列が確認されたプラスミドよりEcoRIおよびXbaＩを用いて消化し、切り出された目的のバンドを抽出後、同制限酵素により予め開裂されたpEF1/Myc-His Aベクターにサブクローニングした。インサートを含むプラスミドをGenopure Plasmid Midi Kitを用いて精製した。

NIH-3T3細胞は10％ウシ胎児血清、ペニシリン/ストレプトマイシンを含むDMEM培地により培養した。トランスフェクションにはFuGENE HDを用いた。試薬に添付されているプロトコールに従って上記で精製したプラスミドとFuGENE HD試薬を混合し、培養下の$2\times10^5$細胞/35mm dishに添加し、72時間培養した。培養培地を回収後、PBSで２度洗浄した後、溶解バッファー(Aoki, Jin-no et al. 2007)[1)]を用いて細胞を溶解した。発現の確認には抗ヒスチジンタグ抗体を使用した。

【結果および考察】

培養上清および細胞溶解液を用いてウエスタンブロットを行ったところ、いずれのウシ・ア

ディポサイトカインもNIH-3T3細胞中で発現し､培地中へ分泌されることが明らかとなった(図７)。非還元下のSDS-PAGEで分画してウエスタンブロット解析を実施したところ、３量体、６量体、さらに多量体のアディポネクチンも検出されたことから､NIH-3T3細胞により発現･分泌されたこれらアディポサイトカインはインタクトであることが推測された。

## ３．市販のアディポサイトカインELISAキットを用いたウシ乳汁に含まれるアディポサイトカイン定量の試み

**【材料および方法】**

マウス・アディポネクチンELISAキットとして、レビスアディポネクチンELISAキット、マウス/ラットアディポネクチンELISAキットを使用した。マウス・レプチンELISAキットとして、レビスレプチンELISA、レプチン・マウス/ラットELISAキット、マウス・レジスチンELISAキットとして、Resistin, mouse ELISA kitを用いた。取扱説明書に因れば、いずれもヒト・アディポサイトカインとは免疫交差性を示さないとあるが、ウシ・アディポサイトカインと免疫交差性を示すかどうかは定かでない。また個別に問い合わせても明確な回答は得られなかった。

ウシ初乳および常乳（２ヵ月乳）は三重県畜産研究所（三重県松阪市）より山本泰也博士のご厚意により譲渡されたものを使用した。搾乳後直ちに-80℃で保存し、使用時は一晩かけて4℃で解凍した。凍結・融解は一度に限定した。乳汁を5,000 X gで30分間遠心分離することにより得られた中間層を脱脂乳（ホエー画分）として実験に用いた。

3T3-L1細胞は10％ウシ胎児血清（FCS)、ペニシリン/ストレプトマイシンを含むDMEM培地（高グルコース）により培養した（これを基本培地とした)。6-well plateに50％程度の密度で細胞を播種し（2 mL/well)、コンフルエントになった時点で培地を交換した。2日間培養してハイパーコンフルエントとなった細胞に対して脂肪細胞分化誘導培地（基本培地に10μg/mLインスリン、0.25 μM dexamethasone、0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthineを添加）を添加し（この時点をDay 0とする)、さらに2日間培養した。以降の培地は、基本培地に5 μg/mLインスリンを添加したものとし、２、３日毎に交換した。Day 8ーDay 10の48時間の培養培地をアディポサイトカイン定量ELISAのポジティブコントロールとした。また上記の通り、ウシ・アディポサイトカインcDNAをトランスフェクトしたNIH-3T3細胞の培養上清も同様にELISAに供した。

**【結果および考察】**

ウシアディポサイトカインに特化したELISAキットは市販されていない。しかしながら図８ー１０に示すように、ウシ、ヒト、マウスの種間でそれぞれのアディポサイトカインのアミノ酸配列が良く保存されていること、ポジティブコントロールとして培養下のマウス3T3-L1脂肪細胞の培養上清が利用できることを考慮して､マウスアディポサイトカイン用のELISAキットを用いて定量を試みた。またレプチンの場合、乳脂肪画分にその一部が含まれるという報告もあることから(Casabiell, Pineiro et al. 1997[5]；Houseknecht, McGuire et al. 1997[6]；Smith-Kirwin, O'Connor et al. 1998[11]；Aoki, Kawamura et al. 1999)[2]、比較のために全乳に加え脱脂乳もアッセイに供した。結果を図１１ー１３に示す。アディポネクチンの場合、２つの異なるELISAキットを用いても初乳、常乳いずれのサンプルでもほとんど検出出来なかった。図７でウシ・アディポネクチ

ンの発現が観察された培養上清を用いても同様な結果であったことを考えると、両ELISAキットに用いられている抗体はウシ・アディポネクチンとは免疫交差性を示さない可能性が高いと判断した。レプチンの場合、1つのELISAキットを用いた場合、初乳サンプルおよびトランスフェクションされた細胞の培養上清でわずかではあるが免疫交差性が認められた。ただしマウスやヒト乳汁中のレプチン濃度が数ng/mLー数10ng/mLであることを考えると、今回ウシ乳汁中で検出されたレプチン濃度は一桁少なく、個体間のばらつきも非常に大きいことから、用いられている抗体の免疫交差性は弱く、脆弱であることが考えられる。レジスチンの場合も同様に、乳汁サンプルではほとんど免疫交差性が認められず、培養上清を用いた場合にのみわずかに認められるのみであった。

残念ながら、ウシ乳汁に含まれるアディポネクチン、レプチン、レジスチンいずれも明確に検出することは出来なかった。培養下の細胞に導入して分泌されたそれぞれのタンパク質も明確に検出出来なかったことから、今回用いたELISAキットに使用されている抗体はウシ・アディポサイトカインとの免疫交差性がない、あったとしてもごくわずかと判断せざるを得ない。ELISAキットと同様に、ウシ・アディポサイトカインに対する特異抗体は、申請者らが調べた限り市販されていない。市販あるは自ら調製したマウスあるいはラットのアディポネクチン、レプチン、レジスチンに対する特異抗体を複数用いて、図７で得られた培養上清を抗原とした免疫ブロットを行ったがやはり明確な免疫交差性は得られなかった（data not shown)。従って、次にウシ・アディポサイトカインを免疫源としてウサギ特異抗体の作製を試みた。

## ４．抗ウシアディポサイトカイン抗体の調製

**【材料および方法】**

ウシ・アディポネクチンの場合、C末端の15アミノ酸残基DSTFTGFLLYHNIVEを化学合成し、keyhole-limpet hemocyanin (KHL) にコンジュゲートしたものを抗原としてウサギに免疫した。ウシ・レプチンの場合も同様に、C末端の15アミノ酸残基SLQDMLRQLDLSPGCを化学合成し、KHLにコンジュゲートしたものを抗原としてウサギに免疫した。レジスチンの場合も同様に、C末端の15アミノ酸残基GMDWTGARCCRLHIQを化学合成し、KHLにコンジュゲートしたものを抗原としてウサギに免疫した。免疫スケジュール等は定法に従った。なお、今回の抗体作製は外部業者に委託した。

**【結果および考察】**

調製されたウサギ抗血清を用いて、図７で得られた培養上清を抗原としたウエスタンブロット解析を行った。図14に示すように、いずれの抗体も弱いながらもそれぞれ発現させたアディポサイトカインを認識出来ることが分かり、特異抗体の作製に成功したといえる。しかしながら現時点で抗体価が非常に弱く、我々が普段利用している条件下で数百倍程度の希釈率でようやく検出できるという状況である。従って、再度ブースト免疫し、抗体価を上げるなどの対処が必要に考えている。

## ５．リコンビナントウシ・アディポネクチンの調製

**【材料および方法】**

ウシ・アディポネクチンのC末端を以下の２つ特異プライマーで増幅し、pET-32a（+）vectorのEcoRI／SalIサイトに挿入した。

sense primer：5’-ATGAATTCGTGAAGGTGAGCCTCTTCAAG-3’

antisense primer：5’-ATGTCGACTTCAACAATGTTATGGTAGAG-3’

BL21株を形質転換し、0.1mM IPTGで発現誘導を行った。培養液を4℃，12,000 rpm，3min遠心分離により回収後、50 mM リン酸buffer，pH7.0を菌体量 約0.05 g当たり500 μL加え，ソニケーション約15秒（10回振動：out put 1、Duty40、氷上)、約1 min静置（氷上）を3回繰り返した。8 M尿素溶液を、ソニケーション後の沈殿に加え（5ー6 mL/g)、よく懸濁し、RTで1h静置した。その後、4℃、12,000 rpm，30 min遠心分離し上清を透析チューブへ移し、4 M尿素溶液（1 L）で、4℃、2h透析した。次いで、透析外液を2 M尿素溶液（1 L）に変え4℃、2h透析した後、50 mM リン酸buffer、pH7.0（500 mL）で4℃、1h透析し、さらに同buffer（1.5 L）で4℃、一晩透析を行った。その後、透析チューブから溶液を回収し、4℃，13,000 rpm，30 min遠心分離を行い、上清画分を回収した。これをNiセファロース1 mLと混合し、4℃で一晩撹拌しながらインキュベートし、カラムに詰めた。50 mM リン酸buffer、pH7.0で十分洗浄後、500 mMイミダゾールを含む50 mM リン酸buffer、pH7.0で溶出させた。

## 【結果および考察】

ウシ・アディポネクチン定量のためにリコンビナントタンパク質の大腸菌での発現と精製を試みた。Hydropathy plot検索の結果を参考にしてC末端側の比較的親水性の高い領域を選んでチオレドキシン・ヒスチジンタグ融合タンパク質として大腸菌で発現させた。当初可溶性画分としての回収を目論んだが、多くのタンパク質の場合と同様に不溶性画分にほぼすべてのタンパク質が回収された。尿素による可溶化と段階的に濃度を下げた尿素を含む緩衝液への透析を繰り返すことにより可溶性タンパク質を得ることが出来、Niセファロースカラムを用いたアフィニティーカラムを用いて精製度ほぼ100%のリコンビナントタンパク質を調製することが出来た（図１５)。このリコンビナントタンパク質は上記で得られたウシ・アディポネクチンに対する特異抗体によっても認識されたことから、ELISAの標準タンパク質としての利用も可能になると考えられる。

## 【結語】

３種のウシ・アディポサイトカイン、すなわちアディポネクチン、レプチン、レジスチンcDNAをクローニングし、培養下の細胞で発現させることに成功した。また弱い抗体価ながらも特異抗体の取得に成功した。またウシ・アディポネクチンの標準タンパク質標品も得ることが出来た。結果的にウシ乳汁に含まれるアディポサイトカインの明確な定量を実施することは出来なかったが、得られた特異抗体を精製し、ビオチン化するなどしてウシ乳汁に含まれるそれぞれのアディポサイトカイン定量の確立は今後可能と考えられる。またトランスフェクションされた培養細胞の培養上清を用いた予備実験ではあるが、アディポネクチン、レプチンは、酸処理やトリプシン処理にも比較的安定であることも判明しているので、乳汁に含まれるアディポサイトカインが摂取後腸管内で比較的安定に存在する可能性も十分あり得る。

## 文献


1 Aoki, N., S. Jin-no, et al. (2007). Identification and characterization of microvesicles secreted by 3T3-L1 adipocytes: redox- and hormone-dependent induction of milk fat globule-epidermal growth factor 8-associated microvesicles. Endocrinology 148(8): 3850-62.

2 Aoki, N., M. Kawamura, et al. (1999). Lactation-dependent down regulation of leptin production in mouse mammary gland. Biochim Biophys Acta 1427(2): 298-306.

3 Aoki, N., M. Kishi, et al. (1995). Molecular cloning of glycoprotein antigens MGP57/53 recognized by monoclonal antibodies raised against bovine milk fat globule membrane. Biochim Biophys Acta 1245(3): 385-91.

4 Bronsky, J., M. Karpisek, et al. (2006). Adiponectin, adipocyte fatty acid binding protein, and epidermal fatty acid binding protein: proteins newly identified in human breast milk. Clin Chem 52(9): 1763-70.

5 Casabiell, X., V. Pineiro, et al. (1997). Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake. J Clin Endocrinol Metab 82(12): 4270-3.

6 Houseknecht, K. L., M. K. McGuire, et al. (1997). Leptin is present in human milk and is related to maternal plasma leptin concentration and adiposity. Biochem Biophys Res Commun 240(3): 742-7.

7 Ilcol, Y. O., Z. B. Hizli, et al. (2008). Resistin is present in human breast milk and it correlates with maternal hormonal status and serum level of C-reactive protein. Clin Chem Lab Med 46(1): 118-24.

8 Lage, M., R. Baldelli, et al. (2002). Presence of bovine leptin in edible commercial milk and infant formula. J Endocrinol Invest 25(8): 670-4.

9 Martin, L. J., J. G. Woo, et al. (2006). Adiponectin is present in human milk and is associated with maternal factors. Am J Clin Nutr 83(5): 1106-11.

10 O'Connor, D., V. Funanage, et al. (2003). Leptin is not present in infant formulas. J Endocrinol Invest 26(5): 490.

11 Smith-Kirwin, S. M., D. M. O'Connor, et al. (1998). Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk. J Clin Endocrinol Metab 83(5): 1810-3.

12 Yoneda, K., A. Tomimoto, et al. (2008). Expression of adiponectin receptors, AdipoR1 and AdipoR2, in normal colon epithelium and colon cancer tissue. Oncol Rep 20(3): 479-83.
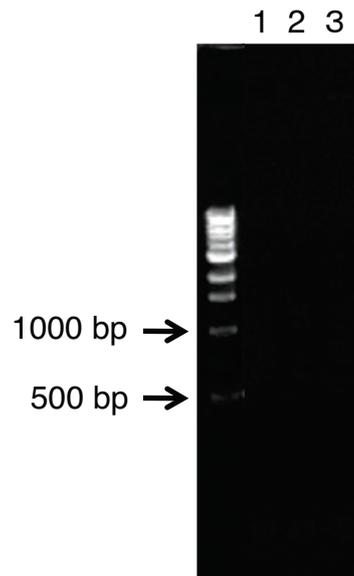
**図１ ウシ・アディポネクチン、レプチン、レジスチンの増幅**
ウシ乳腺cDNAライブラリーを鋳型として、特異プライマーを用いてウシ・アディポネクチン（レーン1）、レプチン（レーン2）、レジスチン（レーン3）の増幅を試みた。
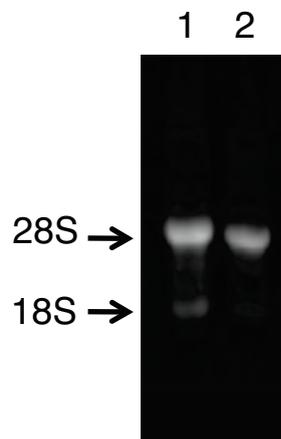
**図２ ウシ脂肪組織からのRNAの抽出**
ウシ脂肪組織２片より、Trizol試薬を用いてトータルRNAを抽出し、その一部をアガロースゲル電気泳動により分画し、エチジウムブロマイドにより染色後、UV照射下で撮影した。
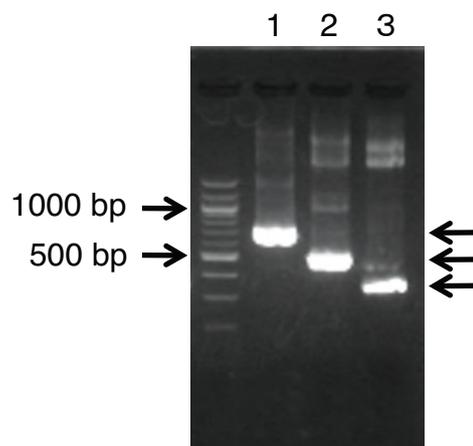
**図３ ウシ・アディポネクチン、レプチン、レジスチンの増幅**
図２で得られたウシ脂肪組織由来RNAを鋳型としてcDNAを合成した後、特異プライマーを用いてウシ・アディポネクチン（レーン1）、レプチン（レーン2）レジスチン（レーン3）を増幅した。矢印の増幅産物をpGEM-T-Easyベクターへクローニングした。

```
Query  1    ATGCTGCTGCAGGGAGCTCTTCTACTGCTACTAGCCTTACCCAGTCATGGCGAGGACAAC  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  69   ATGCTGCTGCAGGGAGCTCTTCTACTGCTACTAGCCTTACCCAGTCATGGCGAGGACAAC  128

Query  61   ATGGAAGATCCCCCGCTGCCCAAGGGGGCCTGCGCAGGTTGGATGGCAGGCATCCCAGGA  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  129  ATGGAAGATCCCCCGCTGCCCAAGGGGGCCTGCGCAGGTTGGATGGCAGGCATCCCAGGA  188

Query  121  CATCCTGGCCACAATGGCACACCAGGCCGTGATGGCAGAGATGGCACTCCTGGAGAGAAG  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  189  CATCCTGGCCACAATGGCACACCAGGCCGTGATGGCAGAGATGGCACTCCTGGAGAGAAG  248

Query  181  GGAGAGAAAGGAGATGCAGGTCTTCTTGGTCCTAAGGGTGAGACAGGAGATGTTGGAATG  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  249  GGAGAGAAAGGAGATGCAGGTCTTCTTGGTCCTAAGGGTGAGACAGGAGATGTTGGAATG  308

Query  241  ACAGGAGCTGAAGGGCCACGGGGCTTCCCCGGAACCCCTGGCAGGAAAGGAGAGCCTGGA  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  309  ACAGGAGCTGAAGGGCCACGGGGCTTCCCCGGAACCCCTGGCAGGAAAGGAGAGCCTGGA  368

Query  301  GAAGCCGCTTATGTGTATCGCTCAGCGTTCAGTGTGGGGCTGGAGACCCGCGTCACTGTT  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  369  GAAGCCGCTTATGTGTATCGCTCAGCGTTCAGTGTGGGGCTGGAGACCCGCGTCACTGTT  428

Query  361  CCCAATGTACCCATTCGCTTTACTAAGATCTTCTACAACCAACAGAATCATTATGACGGC  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  429  CCCAATGTACCCATTCGCTTTACTAAGATCTTCTACAACCAACAGAATCATTATGACGGC  488

Query  421  AGCACTGGCAAGTTCTACTGCAACATTCCGGGACTCTACTACTTCTCTTACCACATCACG  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  489  AGCACTGGCAAGTTCTACTGCAACATTCCGGGACTCTACTACTTCTCTTACCACATCACG  548

Query  481  GTGTACATGAAAGATGTGAAGGTGAGCCTCTTCAAGAAGGACAAGGCCGTTCTCTTCACC  540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  549  GTGTACATGAAAGATGTGAAGGTGAGCCTCTTCAAGAAGGACAAGGCCGTTCTCTTCACC  608

Query  541  TACGACCAGTATCAGGAAAAGAATGTGGACCAGGCCTCTGGCTCTGTGCTCCTCCATCTG  600
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  609  TACGACCAGTATCAGGAAAAGAATGTGGACCAGGCCTCTGGCTCTGTGCTCCTCCATCTG  668

Query  601  GAGGTGGGAGACCAAGTCTGGCTCCAGGTGTACGAGGGTGAAAATCACAATGGGGTCTAT  660
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  669  GAGGTGGGAGACCAAGTCTGGCTCCAGGTGTACGAGGGTGAAAATCACAATGGGGTCTAT  728

Query  661  GCAGATAATGTCAATGACTCCACCTTCACAGGCTTCCTTCTCTACCATAACATTGTTGAA  720
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  729  GCAGATAATGTCAATGACTCCACCTTCACAGGCTTCCTTCTCTACCATAACATTGTTGAA  788

Query  721  TGA  723
            |||
Sbjct  789  TGA  791
```

**図４　増幅したウシ・アディポネクチンcDNAの塩基配列とデータベースとの比較**

RT-PCRにより増幅したウシ・アディポネクチンcDNA配列(Query)を解析し，Blast serchによりデータベース上のウシ・アディポネクチンcDNA配列(Sbjct)と比較した。

```
Query  1    ATGCGCTGTGGACCCCTGTATCGATTCCTGTGGCTTTGGCCCTATCTGTCTTACGTGGAG  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  48   ATGCGCTGTGGACCCCTGTATCGATTCCTGTGGCTTTGGCCCTATCTGTCTTACGTGGAG  107

Query  61   GCTGTGCCCATCTGCAAGGTCCAGGATGACACCAAAACCCTCATCAAGACAATTGTCACC  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  108  GCTGTGCCCATCTGCAAGGTCCAGGATGACACCAAAACCCTCATCAAGACAATTGTCACC  167

Query  121  AGGATCAATGACATCTCACACACGCAGTCCGTCTCCTCCAAACAGAGGGTCACTGGTTTG  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  168  AGGATCAATGACATCTCACACACGCAGTCCGTCTCCTCCAAACAGAGGGTCACTGGTTTG  227

Query  181  GACTTCATCCCTGGGCTCCACCCTCTCCTGAGTTTGTCCAAGATGGACCAGACATTGGCG  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  228  GACTTCATCCCTGGGCTCCACCCTCTCCTGAGTTTGTCCAAGATGGACCAGACATTGGCG  287

Query  241  ATCTACCAACAGATCCTCACCAGTCTGCCTTCCAGAAATGTGGTCCAAATATCCAATGAC  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  288  ATCTACCAACAGATCCTCACCAGTCTGCCTTCCAGAAATGTGGTCCAAATATCCAATGAC  347

Query  301  CTGGAGAACCTCCGGGACCTTCTCCACCTGCTGGCCGCCTCCAAGAGCTGCCCCTTGCCG  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  348  CTGGAGAACCTCCGGGACCTTCTCCACCTGCTGGCCGCCTCCAAGAGCTGCCCCTTGCCG  407

Query  361  CAGGTCAGGGCCCTGGAGAGCTTGGAGAGCTTGGGCGTTGTCCTGGAAGCTTCCCTCTAC  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  408  CAGGTCAGGGCCCTGGAGAGCTTGGAGAGCTTGGGCGTTGTCCTGGAAGCTTCCCTCTAC  467

Query  421  TCCACCGAGGTGGTGGCCCTGAGCCGGCTGCAGGGGTCACTACAGGACATGTTGCGGCAG  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  468  TCCACCGAGGTGGTGGCCCTGAGCCGGCTGCAGGGGTCACTACAGGACATGTTGCGGCAG  527

Query  481  CTGGACCTCAGTCCCGGGTGCTGA  504
            ||||||||||||||||||||||||
Sbjct  528  CTGGACCTCAGTCCCGGGTGCTGA  551
```

**図５ 増幅したウシ・レプチンcDNAの塩基配列とデータベースとの比較**
RT-PCRにより増幅したウシ・レプチンcDNA配列(Query)を解析し、Blast serchによりデータベース上のウシ・レプチンcDNA配列(Sbjct)と比較した。

```
Query  1    ATGAAGGCTCTCTCCTTCCTCTTCATCCCAGTCCTGGGGCTGCTGGTGTGTGGCCAGTCG  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  49   ATGAAGGCTCTCTCCTTCCTCTTCATCCCAGTCCTGGGGCTGCTGGTGTGTGGCCAGTCG  108

Query  61   CTGTGCCCCATAGATAAAGCCATCAGTGAGAAGATCCAGGAGGTCACCACCTCCCTAGTT  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  109  CTGTGCCCCATAGATAAAGCCATCAGTGAGAAGATCCAGGAGGTCACCACCTCCCTAGTT  168

Query  121  CCTGGGGCAGTAAGGATCATTGGCCTGGACTGCCGGAGTGTCACCTCTAGGGGGTCCCTG  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  169  CCTGGGGCAGTAAGGATCATTGGCCTGGACTGCCGGAGTGTCACCTCTAGGGGGTCCCTG  228

Query  181  GTCACCTGCCCTTCAGGCTTCGCCGTCACTGGCTGCACGTGTGGCTCCGCCTGTGGCTCG  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  229  GTCACCTGCCCTTCAGGCTTCGCCGTCACTGGCTGCACGTGTGGCTCCGCCTGTGGCTCG  288

Query  241  TGGGACGTACGTGCTGAGACCACGTGCCACTGCCAGTGCGCAGGCATGGACTGGACTGGA  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  289  TGGGACGTACGTGCTGAGACCACGTGCCACTGCCAGTGCGCAGGCATGGACTGGACTGGA  348

Query  301  GCTCGCTGCTGCCGCCTGCATATCCAGTAG  330
            ||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  349  GCTCGCTGCTGCCGCCTGCATATCCAGTAG  378
```

**図６　増幅したウシ・レジスチンcDNAの塩基配列とデータベースとの比較**
RT-PCRにより増幅したウシ・レジスチンcDNA配列(Query)を解析し、Blast serchによりデータベース上のウシ・レジスチンcDNA配列(Sbjct)と比較した。
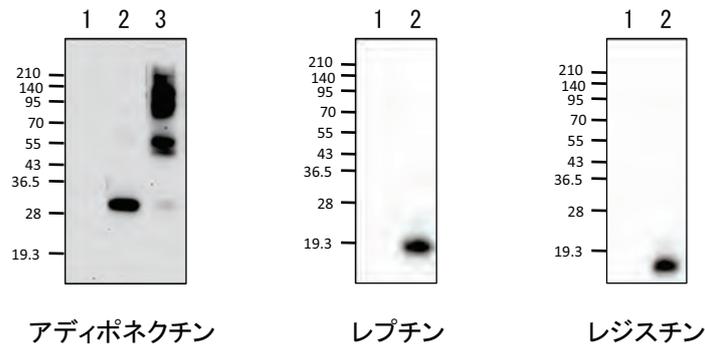
**図７ エピトープタグ付きウシ・アディポサイトカインの発現・分泌**
His/Mycタグを含むそれぞれの発現プラスミドをNIH-3T3細胞に導入し、得られた培養上清を還元下（lane１および２）あるいは非還元下（lane３）でSDS-PAGEにより分画後、Hisタグに対する特異抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。lane１はcDNAを含まない親ベクターを導入した細胞の培養上清を用いた。
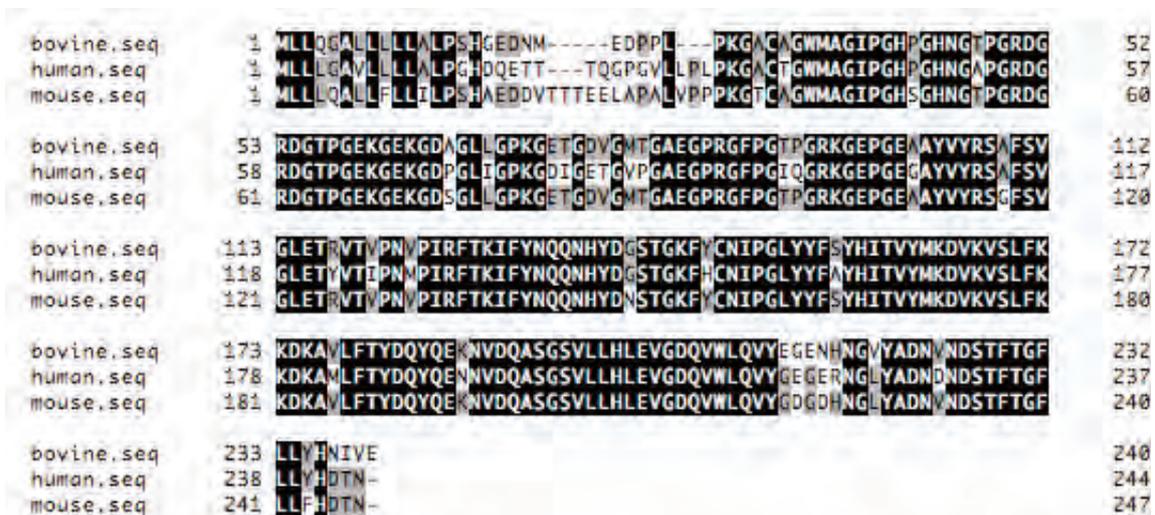
**図８ ウシ、ヒト、マウス・アディポネクチンのアミノ酸配列の比較**
GENETYX-MACソフトウェアのMultiple-Alignment機能によりアミノ酸配列を比較した。白抜きは３種間で相同なアミノ酸を、グレーの網掛けはいずれか２種間で相同なアミノ酸を示す。

**図９ ウシ、ヒト、マウス・レプチンのアミノ酸配列の比較**
GENETYX-MACソフトウェアのMultiple-Alignment機能によりアミノ酸配列を比較した。白抜きは３種間で相同なアミノ酸を、グレーの網掛けはいずれか２種間で相同なアミノ酸を示す。

**図１０ ウシ、ヒト、マウス・レジスチンのアミノ酸配列の比較**
GENETYX-MACソフトウェアのMultiple-Alignment機能によりアミノ酸配列を比較した。白抜きは３種間で相同なアミノ酸を、グレーの網掛けはいずれか２種間で相同なアミノ酸を示す。
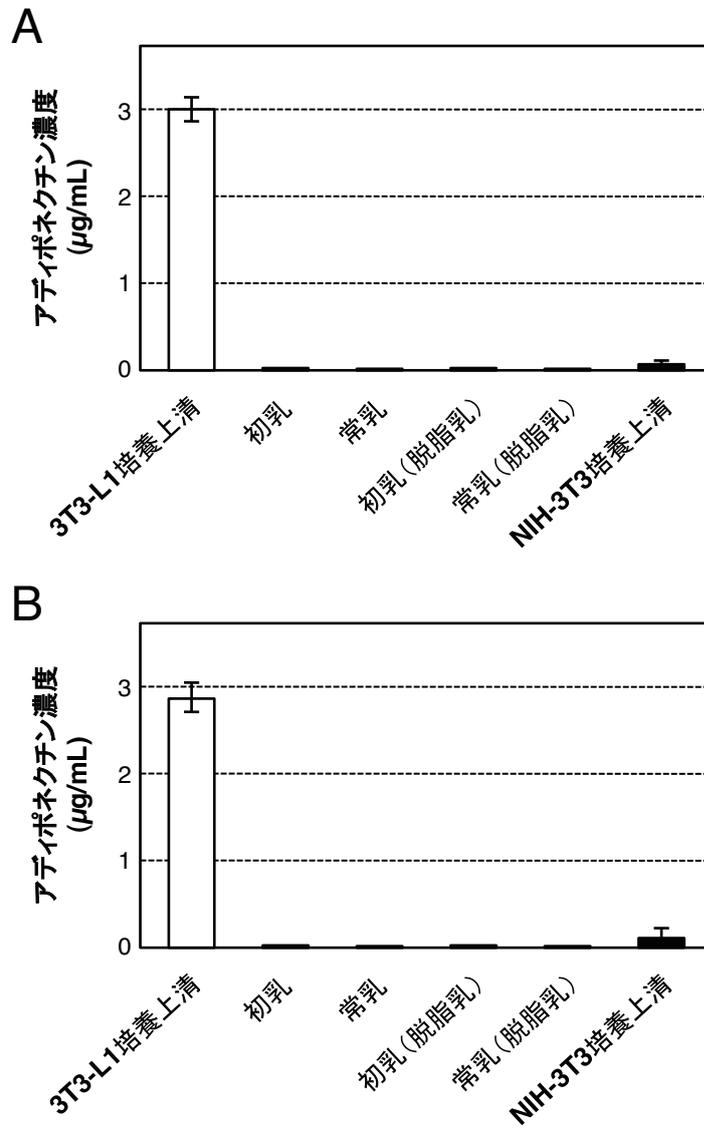
**図１１ 牛乳中に含まれるアディポネクチンの定量**

市販のマウス用ELISAキットを用いてアッセイを行った。パネルＡはシバヤギ社製、パネルBは大塚製薬社製を用いた。ポジティブコントロールとして3T3-L1脂肪細胞培養上清を用いた。またウシ・アディポネクチン発現プラスミドを導入したNIH-3T3細胞の培養上清もアッセイに供した。結果は平均±標準偏差（n=3）で示した。
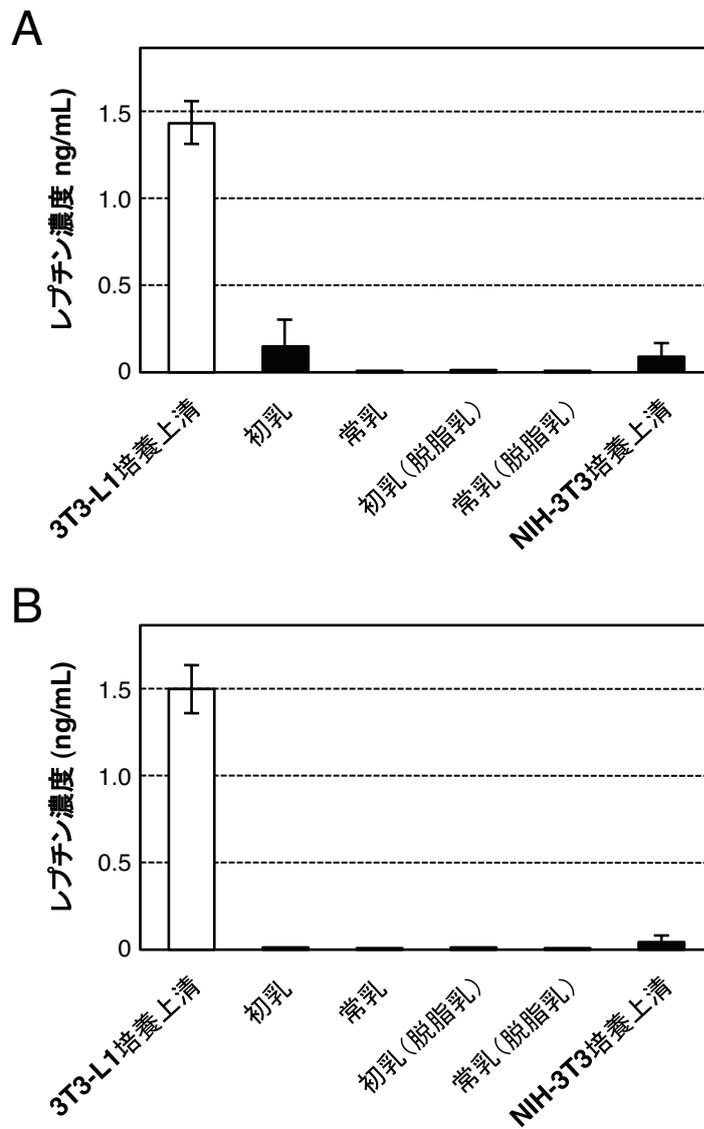
**図１２ 牛乳中に含まれるレプチンの定量**
市販のマウス用ELISAキットを用いてアッセイを行った。パネルＡはシバヤギ社製、パネルBは森永製菓社製を用いた。ポジティブコントロールとして3T3-L1脂肪細胞培養上清を用いた。またウシ・レプチン発現プラスミドを導入したNIH-3T3細胞の培養上清もアッセイに供した。結果は平均±標準偏差（n=3）で示した。
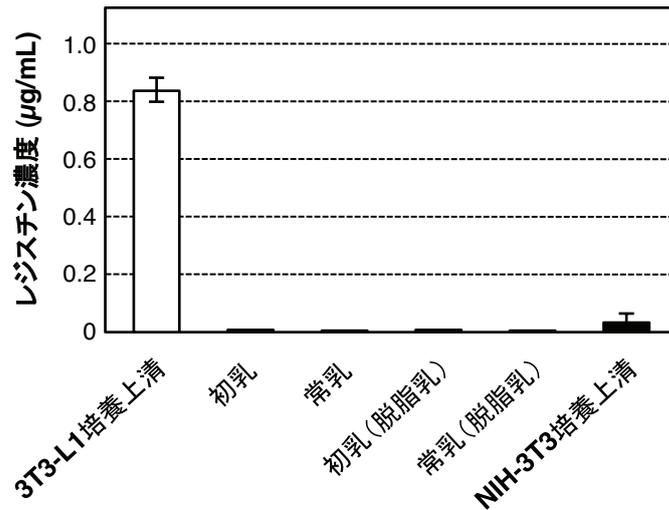
**図１３　牛乳中に含まれるレジスチンの定量**
市販のマウス用ELISAキット（Ｒ＆Ｄ社）を用いてアッセイを行った。ポジティブコントロールとして3T3-L1脂肪細胞培養上清を用いた。またウシ・レジスチン発現プラスミドを導入したNIH-3T3細胞の培養上清もアッセイに供した。結果は平均±標準偏差（n=3）で示した。
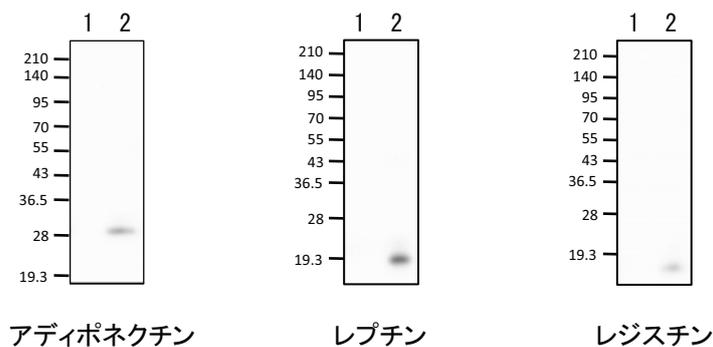
**図１４　ウシ・アディポサイトカインに対するペプチド抗体の評価**
His/Mycタグを含むそれぞれの発現プラスミドをNIH-3T3細胞に導入し、得られた培養上清を還元下でSDS-PAGEにより分画後、各タンパク質に対して調製したペプチド抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った（lane 2）。lane１はcDNAを含まない親ベクターを導入した細胞の培養上清を用いた。
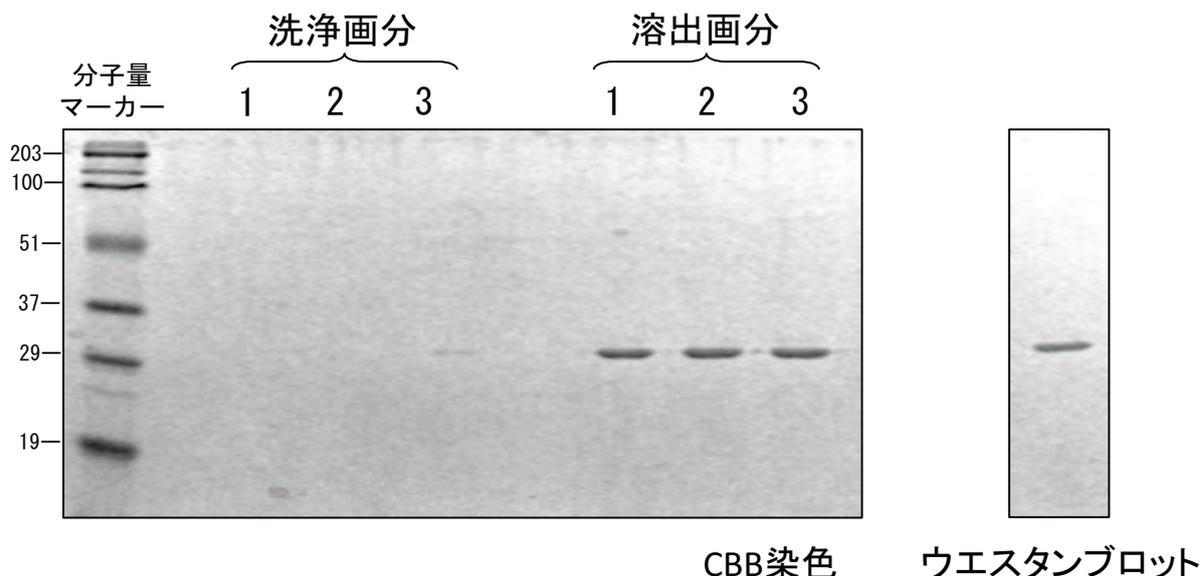
図１５ リコンビナント・ウシ・アディポネクチンの精製
ウシ・アディポネクチンのC末端領域をチオレドキシン・ヒスチジンタグ融合タンパク質として大腸菌で発現させ，尿素で可溶化させた画分よりNiセファロースカラムを用いて精製した。洗浄画分と溶出画分の一部をSDS-PAGEで分画後，CBBで染色した（左パネル）。溶出画分１の一部を図１４で得られたウシ・アディポネクチンに対する特異抗体を用いてウエスタンブロットした（右パネル）。

## 表1 ウシ・アディポサイトカインcDNA増幅に用いた特異プライマー

| 標的遺伝子 | オリゴ名 | 配列 | ターゲット塩基 | 増幅産物（bp） |
|---|---|---|---|---|
| ウシ・アディポネクチン (NM_174742) | b-Adipo-S | ATGCTGCTGCAGGGAGCT | 69-86 | 723 |
| | b-Adipo-AS | TCATTCAACAATGTTATGGTA | 771-791 | |
| ウシ・レプチン (NM_173928) | b-Lep-S | ATGCGCTGTGGACCCCTG | 48-65 | 504 |
| | b-Lep-AS | TCAGCACCCGGGACTGAGGTC | 531-551 | |
| ウシ・レジスチン (BC148022) | b-Res-S | ATGAAGGCTCTCTCCTTC | 49-66 | 330 |
| | b-Res-AS | CTACTGGATATGCAGGCGGCA | 358-378 | |

## 表2 ウシ・アディポサイトカインタグ付加に用いた特異プライマー

| 標的遺伝子 | オリゴ名 | 配列 | ターゲット塩基 | 増幅産物（bp） |
|---|---|---|---|---|
| ウシ・アディポネクチン (NM_174742) | b-Adipo-S-EcoRI | ATGAATTC-CACC-ATGCTGCTGCAGGGAGCT | 69-86 | 740 (タグ分を含む) |
| | b-Adipo-AS-XbaI | ATTCTAGA-TTCAACAATGTTATGGTA | 771-791 | |
| ウシ・レプチン (NM_173928) | b-Lep-S-EcoRI | ATGAATTC-CACC-ATGCGCTGTGGACCCCTG | 48-65 | 521 (タグ分を含む) |
| | b-Lep-AS-XbaI | ATTCTAGA-GCACCCGGGACTGAGGTC | 531-551 | |
| ウシ・レジスチン (BC148022) | b-Res-S-EcoRI | ATGAATTC-CACC-ATGAAGGCTCTCTCCTTC | 49-66 | 347 (タグ分を含む) |
| | b-Res-AS-XbaI | ATTCTAGA-CTGGATATGCAGGCGGCA | 358-378 | |